Die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Stylonychinae BERGER & FOISSNER, 1997 (Spirotrichea, Stichotrichia, Oxytrichidae) rekonstruiert mit Sequenzen der 18S rDNA*

Stephanie L. SCHMIDT, Detlef BERNHARD & Martin SCHLEGEL

Abstract: Phylogenetic relationships within the Stylonychinae BERGER & FOISSNER, 1997 (Spirotrichea, Stichotrichia, Oxytrichidae) reconstructed with 18S rDNA sequences. – Members of the Stylonychinae are characterised by a rigid body, the lack of cortical granules, and an adoral zone of membranelles which span usually more than 40 % of the body length. Within this subfamily, especially within some genera many taxonomical problems occurred. Therefore, the phylogenetic relationships were studied with special focus on the genera *Stylonychia*, *Tetmemena*, and *Sterkiella* and based on sequence analyses of the 18S rDNA. These analyses affirmed the clear separation of *Stylonychia*, consisting of representatives of the *S. mytilus*-complex, and *Tetmemena* with *T. pustulata*. The newly analysed *Stylonychia notophora* was found together with *Tetmemena pustulata*, whereas *Stylonychia ammermanni* was confirmed as a member of the *S. mytilus*-complex. The genus *Sterkiella* did not form a monophylum, because the isolates of *S. nova* and *S. histriomuscorum* are clearly separated in our analyses. Furthermore, *Stylonychia bifaria* branched off within the *Sterkiella nova*-group. For a better clarification of the stylonychinean taxonomy, more molecular data are required, particularly of reliably determined isolates.

Key words: Ciliophora, *Histriculus*, phylogeny, *Sterkiella*, *Stylonychia*, *Tetmemena*.

Einleitung

Die Oxytrichidae bilden die umfangreichste Teilgruppe der Stichotrichia. Vertreter dieser Familie sind durch ihr typisches fronto-ventral-transversales (FVT) Cirrenmuster charakterisiert, welches normalerweise 18 Cirren umfasst. Die Untergliederung in die beiden Unterfamilien Oxytrichinae und Stylonychinae erfolgte zunächst mittels cladistischer Analysen von morphologischen und ontogenetischen Merkmalen (BERGER & FOISSNER 1997). So sind alle Vertreter der Stylonychinae z.B. durch einen starren, rigiden Zellkörper und durch das Fehlen corticaler Granula gekennzeichnet. Zudem weist die adorale Membranellenzone (AZM) eine Länge von mehr als 40 % im Vergleich zur Gesamtlänge des Zellkörpers auf (BERGER 1999). Oxytrichine Ciliaten hingegen besitzen i.d.R. einen flexiblen Zellkörper und ihre AZM entspricht gewöhnlich nur maximal 40 % der Gesamtlänge des Zellkörpers. Darüber hinaus sind corticale Granula bei den meisten Arten vorhanden, diese können aber auch fehlen (BERGER 1999).

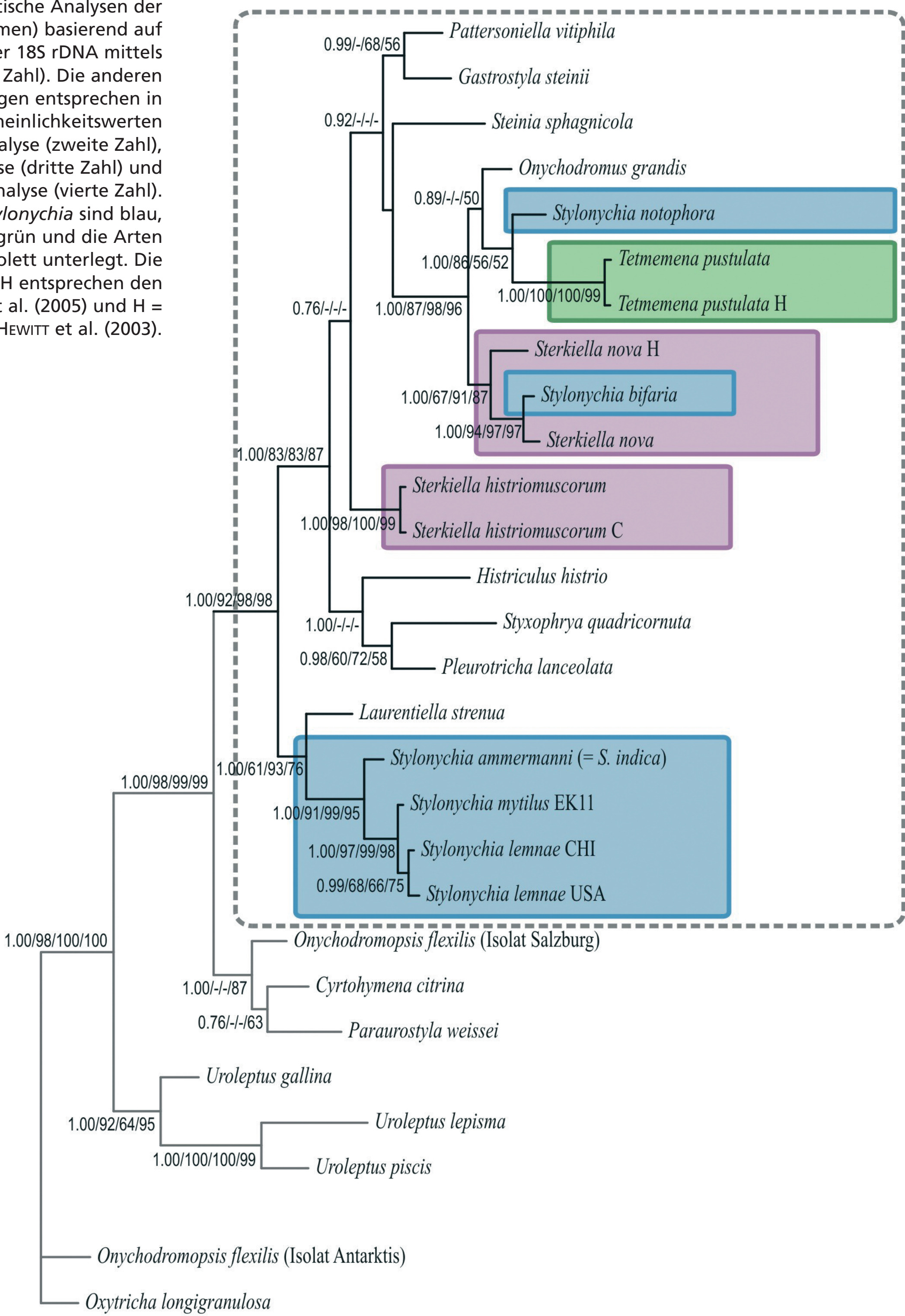
Die Unterschiede bezüglich der „Konsistenz des Zellkörpers" bestehen in ultrastrukturellen Merkmalen. So lässt sich die Steifheit des Zellkörpers stylonychiner Ciliaten auf das Vorhandensein mehrerer Schichten subpelliculärer Mikrotubuli zurückführen, die zum Teil kreuzweise zueinander angeordnet sind. Im Gegensatz hierzu resultiert der flexible Zellkörper typischer Oxytrichinae aus einer einzelnen Schicht parallel angeordneter Mikrotubuli (vgl. BERGER 1999).

In molekularen Analysen wie z.B. des Gens der kleinen ribosomalen Untereinheit (18S rDNA) sind die Vertreter der Oxytrichinae in den phylogenetischen Analysen in verschiedenen Gruppen zu finden, während die Stylonychinae stets ein Monophylum bilden (BERNHARD et al. 2001; HEWITT et al. 2003; FOISSNER et al. 2004; SCHMIDT et al. 2007).

Zu den Vertretern der Stylonychinae zählen neben den Arten der namensgebenden Gattung *Stylonychia* beispielsweise auch die Gattungen *Sterkiella*, *Tetmemena* und *Onychodromus*. Innerhalb dieser Gattungen erfolgten in den letzten Jahren einige taxonomische Revisionen, die einerseits zum Errichten neuer Gattungen (z.B. *Sterkiella* FOISSNER et al., 1991; *Tetmemena* EIGNER,

* Herrn Professor Dr. Wilhelm FOISSNER in Dankbarkeit für viele Jahre der Unterstützung und Zusammenarbeit zum 60. Geburtstag gewidmet.

Abb. 1: Phylogenetische Analysen der Stylonychinae (Rahmen) basierend auf Sequenzanalysen der 18S rDNA mittels Bayesianischer Analyse (erste Zahl). Die anderen Werte an den Aufzweigungen entsprechen in ihrer Reihenfolge den Wahrscheinlichkeitswerten der Maximum-Likelihood-Analyse (zweite Zahl), der Neighbour-Joining-Analyse (dritte Zahl) und der Maximum-Parsimonie-Analyse (vierte Zahl). Alle Vertreter der Gattung *Stylonychia* sind blau, die der Gattung *Tetmemena* grün und die Arten der Gattung *Sterkiella* violett unterlegt. Die Abkürzungen C und H entsprechen den Referenzen: C = CHANG et al. (2005) und H = HEWITT et al. (2003).



1999 (siehe auch EIGNER 1997); *Styxophrya* FOISSNER et al., 2004) und andererseits zur Translokation einzelner Arten zwischen den Gattungen führten.

Für die Gattung *Stylonychia* wurden mehr als 10 valide Arten beschrieben (vgl. BERGER 1999, 2001; GUPTA et al. 2001; SHI & AMMERMANN 2004), wobei die morphologische Unterscheidung einzelner Arten mitunter äußerst schwierig ist. So ist die Existenz von mindestens einem Artkomplex innerhalb dieser Gattung in der Literatur belegt: Der *S. mytilus*-Komplex beinhaltet die morphologisch und morphogenetisch kaum unterscheidbaren Arten *S. mytilus*, *S. lemnae*, *S. harbinensis* und *S. ammermanni* (AMMERMANN & SCHLEGEL 1983, STEINBRÜCK & SCHLEGEL 1983; GUPTA et al. 2001; SHI

Tab. 1: Systematische Einordnung der in den Analysen verwendeten Arten, Accession numbers (Acc. No.) der jeweiligen 18S rDNA-Sequenzen sowie deren Referenzen.

Familie	Art	Acc. No.	Referenz
Oxytrichidae, Stylonychinae	*Gastrostyla steinii*	AF508758	HEWITT et al. 2003
	Histriculus histrio		**vorliegende Arbeit**
	Laurentiella strenua	AJ310487	BERNHARD et al. 2001
	Onychodromus grandis	AJ310486	BERNHARD et al. 2001
	Pattersoniella vitiphila	AJ310495	BERNHARD et al. 2001
	Pleurotricha lanceolata	AF508768	HEWITT et al. 2003
	Steinia spaghnicola	AJ310494	BERNHARD et al. 2001
	Sterkiella histriomuscorum	AF508770	HEWITT et al. 2003
	Sterkiella histriomuscorum C	AF164121	CHANG et al. 2005
	Sterkiella nova H	AF508771	HEWITT et al. 2003
	Sterkiella nova	X03948	ELWOOD et al. 1985
	Stylonychia ammermanni		**vorliegende Arbeit**
	Stylonychia bifaria		**vorliegende Arbeit**
	Stylonychia lemnae CHI	AJ310496	BERNHARD et al. 2001
	Stylonychia lemnae USA	AM233917	SCHMIDT et al. 2006
	Stylonychia mytilus EK11	AJ310499	BERNHARD et al. 2001
	Stylonychia notophora		**vorliegende Arbeit**
	Styxophrya quadricornuta	X53485	SCHLEGEL et al. 1991
	Tetmemena pustulata H	AF508775	HEWITT et al. 2003
	Tetmemena pustulata	X03947	ELWOOD et al. 1985
Oxytrichidae, Oxytrichinae	*Cyrtohymena citrina*	AY498653	FOISSNER et al. 2004
	Onychodromopsis flexilis (Isolat Antarktis)	AY498652	FOISSNER et al. 2004
	Onychodromopsis flexilis (Isolat Salzburg)	AM412764	SCHMIDT et al. 2007
	Oxytricha longigranulosa	AM412766	SCHMIDT et al. 2007
	Paraurostyla weissei	AJ310485	BERNHARD et al. 2001
Rigidotrichidae	*Uroleptus gallina*	AF508779	HEWITT et al. 2003
	Uroleptus lepisma	AF508765	HEWITT et al. 2003
	Uroleptus piscis	AF508780	HEWITT et al. 2003

& AMMERMANN 2004). Bereits die morphogenetischen Analysen von EIGNER (1997) deuteten darauf hin, dass die Gattung *Stylonychia* möglicherweise keine monophyletische Gruppe bildet. Aus diesem Grund überführte EIGNER (1999) die Arten *S. pustulata* und *S. vorax* in die von ihm errichtete Gattung *Tetmemena*. Molekulare Analysen der 18S rDNA bestätigen diese Auftrennung (z.B. BERNHARD et al. 2001; FOISSNER et al. 2004; SCHMIDT et al. 2007).

Ähnliche taxonomische Probleme traten auch bei weiteren Gattungen der Stylonychinae auf, wie u. a. die Umbenennung von *Oxytricha nova* oder *Histriculus muscorum* in *Sterkiella nova* bzw. *S. histriomuscorum* zeigt (FOISSNER et al. 1991; BERGER & FOISSNER 1997, BERGER 1999). Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen daher Vertreter der Gattungen *Stylonychia*, *Tetmemena* und *Sterkiella*, deren phylogenetische Beziehungen und damit ihre Einordnung im System der Stylonychinae nicht sicher geklärt sind.

Material und Methoden

Bereits isolierte genomische DNA von *Stylonychia ammermanni*, *S. bifaria* und *S. notophora* wurde uns freundlicherweise von G. STEINBRÜCK (Universität Tübingen, Deutschland) bereitgestellt. Zellen von *Histriculus histrio* wurden von W. FOISSNER (Universität Salzburg, Österreich) aus einer Wasserprobe aus dem Botanischen Garten der Universität Salzburg isoliert, identifiziert und für unsere molekularen Arbeiten dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Die DNA-Isolierung, der in 80 %igem unvergällten Ethanol fixierten Zellen, folgte einem modifizierten KAVENOFF-ZIMM-Protokoll (STEINBRÜCK & SCHLEGEL 1983). Die 18S rDNA wurde nachfolgend von allen vier Arten mittels eines spezifischen Protokolls der Polymerasekettenreaktion (PCR; SCHMIDT et al. 2006) mit universellen Eukaryoten-spezifischen Primern (z.B. KORTE et al. 2004) amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit dem NucleoSpin® Extract Kit II der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren, Deutschland) aufgereinigt und anschließend direkt in die Sequenzierreaktionen eingesetzt. Die-

se Reaktionen wurden bidirektional, d.h. für beide DNA-Stränge, mit Hilfe der gleichen Eukaryoten-spezifischen Primer sowie verschiedener interner Primer (WYLEZICH et al. 2002) durchgeführt und unter Nutzung des Sequenziergerätes ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Darmstadt, Deutschland) analysiert.

Nach dem Korrekturlesen wurden die vier neuen 18S rDNA-Sequenzen mit 24 weiteren stichotrichen Sequenzen, die der GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) entnommen wurden, aliniert (CLUSTAL X 1.83; THOMPSON et al. 1997). Die 18S rDNA-Sequenzen der vier neu sequenzierten Arten wurden ebenfalls in der GenBank hinterlegt. Die jeweiligen Zugangsdaten („Accession numbers") und Referenzen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Noch vor Beginn der phylogenetischen Analysen wurden die Sequenzen des 18S Forward-Primers und des 18S Reverse-Primers mit dem Programm BioEdit (HALL 1999) aus dem Alignment entfernt. Der Sequenzdatensatz wurde mit verschiedenen Analysemethoden ausgewertet. Die Maximum-Likelihood-Analyse (ML-Analyse) erfolgte mit dem Programm PAUP* v4.0b10 (SWOFFORD 2002) mit 100 Wiederholungen und unter Beachtung des evolutionären Modells von TAMURA & NEI (1993) mit $I = 0{,}8212$ und $\Gamma = 0{,}6781$. Das verwendete Evolutionsmodell sowie die Parameter I und Γ wurden mit Hilfe des Programms Modeltest 3.6 (POSADA & CRANDALL 1998) ermittelt. Für die Bayesianische Analyse wurde das Programm MrBayes v3.1 (HUELSENBECK & RONQUIST 2001) verwendet. Die Berechnungen erfolgten unter Zuhilfenahme des Evolutionsmodells von TAMURA & NEI (1993) und den oben genannten Parametern (I und Γ), mit 1.000.000 Generationen und einem „initial burnin" von 2500. Sowohl die Neighbour-Joining-Analyse (NJ-Analyse) als auch die Maximum-Parsimonie-Analyse (MP-Analyse) wurden mit dem Programm MEGA 3.1 (KUMAR et al. 2004) durchgeführt. Die NJ-Analyse erfolgte ebenfalls unter Verwendung des Evolutionsmodells von TAMURA & NEI (1993) und 10.000 Wiederholungen, während für die MP-Analyse nur 2000 Replikationen berechnet wurden.

Ergebnisse

Der analysierte Datensatz umfasst die 18S rDNA-Sequenzen von 28 Taxa der Stichotrichia, wobei 20 dieser Sequenzen von Vertretern der Stylonychinae (Oxytrichidae) stammen. Die restlichen acht Sequenzen verteilen sich auf die Oxytrichinae (Oxytrichidae, fünf Taxa) und die Rigidotrichidae (drei Arten). Zwei Vertreter der Oxytrichinae (*Oxytricha longigranulosa* und *Onychodromopsis flexilis* Isolat Antarktis) dienten bei allen durchgeführten Analysen als Außengruppe (Abb. 1).

Das für die phylogenetischen Analysen verwendete Alignment enthält 1730 Nukleotidpositionen, von denen 161 variabel und 113 Parsimonie-informativ sind.

Die Stylonychinae erscheinen in allen Analysen als ein Monophylum, das durch hohe Bootstrap- bzw. Wahrscheinlichkeitswerte unterstützt wird (Abb. 1). Innerhalb der Stylonychinae findet sich eine basale Aufspaltung in ein Cluster bestehend aus *Laurentiella strenua* und den Vertretern des *Stylonychia mytilus*-Komplexes sowie eine Gruppe, die alle übrigen Stylonychinae umfasst. Der *S. mytilus*-Komplex, der in der vorliegenden Arbeit durch *S. ammermanni*, *S. mytilus* und zwei Isolate der Art *S. lemnae* repräsentiert wird, bildet eine monophyletische Gruppe. In dieser zweigt *S. ammermanni* basal ab, dann folgt die Aufspaltung in die Zwillingsarten *S. mytilus* und *S. lemnae*. Die beiden geographisch verschiedenen Isolate von *S. lemnae* gruppieren gemeinsam (Abb. 1). *Laurentiella strenua* bildet als erste Abzweigung innerhalb des ersten Clusters die Schwesterart zum *S. mytilus*-Komplex. Diese Aufzweigungen werden stets von hohen Wahrscheinlichkeitswerten unterstützt.

Die basalen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den übrigen in die Analysen einbezogenen Vertreter der Stylonychinae bleiben meist ungeklärt. Gut abgesichert erscheint lediglich der gemeinsame Ursprung dieser Taxa. Eine gemeinsame Gruppe, bestehend aus *Histriculus histrio*, *Styxophrya quadricornuta* und *Pleurotricha lanceolata*, wird nur durch die Bayesianische Analyse gefunden. Im Gegensatz dazu zeigen alle Analysemethoden ein enges Verwandtschaftsverhältnis von *Styxophrya quadricornuta* und *Pleurotricha lanceolata* (Abb. 1). Die Position der beiden Isolate von *Sterkiella histriomuscorum*, ebenso wie das gemeinsame Cluster aller restlichen Vertreter der Stylonychinae findet sich ebenfalls ausschließlich nur als Ergebnis der Bayesianischen Analyse und wird mit keiner der anderen Methoden so dargestellt. Mit Ausnahme der ML-Analyse wird eine engere Verwandtschaftsbeziehung zwischen *Pattersoniella vitiphila* und *Gastrostyla steinii* aufgezeigt, jedoch wird diese Gruppe sowohl von der NJ- als auch von der MP-Analyse nur schwach unterstützt. Als gesichert kann hingegen die Gruppierung bestehend aus *Onychodromus grandis*, *Stylonychia notophora*, den beiden *Tetmemena pustulata*-Isolaten sowie den beiden Isolaten von *Sterkiella nova* und *Stylonychia bifaria* gelten. Die Aufspaltung in die beiden Gruppen *Onychodromus grandis*, *Stylonychia notophora* und *Tetmemena pustulata* einerseits sowie *Sterkiella nova* und *Stylonychia bifaria* andererseits, ist jedoch nur äußerst schwach unterstützt und sowohl die ML- als auch die NJ-Analysen resultieren hier in einer Trifurkation mit *Onychodromus grandis* als separatem Ast. Darüber hinaus erscheint die Beziehung von *Steinia sphagni-*

cola als Schwestertaxon zu diesem artenreichen Cluster aufgrund unzureichender Unterstützung fragwürdig. Innerhalb der *Sterkiella nova/Stylonychia bifaria*-Gruppe stehen die beiden Isolate der Art *Sterkiella nova* deutlich voneinander separiert. Während das Isolat von *S. nova* (HEWITT et al. 2003) die basale Abzweigung in diesem Cluster bildet, gruppiert das zweite *S. nova*-Isolat (ELWOOD et al. 1985) gemeinsam mit *Stylonychia bifaria*. Diese Aufzweigungen werden durch alle Analyseverfahren sehr gut unterstützt. Im Gegensatz zu *Sterkiella nova* gruppieren die beiden Isolate von *Tetmemena pustulata* mit Wahrscheinlichkeitswerten von nahezu 100 % gemeinsam. Eine Schwesterbeziehung von *Stylonychia notophora* zu den beiden *Tetmemena pustulata*-Isolaten wird ebenfalls von allen phylogenetischen Methoden unterstützt, wobei lediglich die Bayesianische und die ML-Analysen in hohen Werten resultieren.

Außerhalb der monophyletischen Stylonychinae sind zwei weitere Gruppierungen im Stammbaum erkennbar (Abb. 1). Zum einen bilden alle drei Arten der Gattung *Uroleptus* (Rigidotrichidae) eine gemeinsame Gruppe, in der *U. gallina* basal abzweigt. Zum anderen gruppieren *Onychodromopsis flexilis* (Isolat Salzburg), *Cyrtohymena citrina* und *Paraurostyla weissei* (alle Vertreter der Oxytrichinae) gemeinsam. Die in Abbildung 1 dargestellte Abfolge der zuletzt genannten drei Arten wird jedoch nicht mit allen Analysemethoden gefunden. Sowohl ML- als auch NJ-Analysen lösen die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen *Onychodromopsis flexilis* (Isolat Salzburg), *Cyrtohymena citrina* und *P. weissei* nicht sicher auf und resultieren daher in einer Trifurkation. Auffällig ist zudem, dass die beiden geographisch getrennten Isolate von *Onychodromopsis flexilis* auch in den phylogenetischen Analysen deutlich separiert voneinander stehen. Die Abfolge der beiden nicht zu den Stylonychinae gehörenden Gruppierungen ist bei allen verwendeten Analysemethoden einheitlich und wird mit sehr hohen Bootstrap- und Wahrscheinlichkeitswerten unterstützt. So bilden *O. flexilis* (Isolat Salzburg), *Cyrtohymena citrina* und *Paraurostyla weissei* in unseren Analysen die Schwestergruppe zu den Stylonychinae.

Diskussion

In den letzten Jahren hat sich die Anzahl der in der GenBank verfügbaren 18S rDNA-Sequenzen stichotricher Ciliaten stark erhöht. Die auf diesen Sequenzen basierenden Studien beschäftigten sich jedoch vorrangig mit den phylogenetischen Beziehungen zwischen den verschiedenen „Gruppen" der Stichotrichia (z.B. BERNHARD et al. 2001; HEWITT et al. 2003; FOISSNER et al. 2004, FOISSNER & STOECK 2006; SCHMIDT et al. 2007). In Übereinstimmung mit all diesen Untersuchungen und den morphologischen und ontogenetischen Daten (BERGER & FOISSNER 1997, BERGER 1999) bilden die Vertreter der Stylonychinae auch in den vorliegenden Analysen eine monophyletische Gruppe. Zudem finden sich alle vier neu sequenzierten Arten innerhalb dieses Monophylums (Abb. 1).

Die basale Abzweigung innerhalb der Stylonychinae wird, wie bereits auch in den bisherigen Arbeiten gezeigt, von *Laurentiella strenua* und den Arten des *Stylonychia mytilus*-Komplexes gebildet. Auch die auf morphologischen Daten basierende Zuordnung von *S. ammermanni* (GUPTA et al. 2001) zu diesem Komplex wird durch unsere Sequenzanalysen bestätigt. Dagegen zweigen die anderen beiden neu untersuchten Arten der Gattung *Stylonychia* (*S. notophora* und *S. bifaria*) deutlich getrennt vom *S. mytilus*-Komplex ab. Dieses Ergebnis steht nicht unbedingt im Gegensatz zu den Befunden morphologischer und morphogenetischer Studien. So zeigte beispielsweise EIGNER (1997), dass *S. mytilus* und *S. pustulata* verschiedenen phylogenetischen Linien angehören. Daher transferierte er *S. pustulata* gemeinsam mit *S. vorax* in die neue Gattung *Tetmemena* EIGNER, 1999.

Die in der vorliegenden Arbeit neu untersuchte Art *Stylonychia notophora* gruppiert gut unterstützt mit den beiden Isolaten von *Tetmemena pustulata* (Abb. 1). In Anbetracht der Umbenennung von *Stylonychia pustulata* in *Tetmemena pustulata* (EIGNER, 1999) würde es sich bei *Stylonychia notophora* ebenfalls um einen Vertreter der neuen Gattung *Tetmemena* handeln. Bereits WIRNSBERGER et al. (1985) diskutierten eine hohe morphologische und stomatogenetische Übereinstimmung der beiden Arten. Trotz dieser großen Ähnlichkeit zwischen den beiden Arten zeigen jedoch die 18S rDNA-Sequenzen eine deutliche genetische Distanz (Abb. 1).

Die dritte, neu untersuchte Art der Gattung *Stylonychia* (*S. bifaria*) steht in unseren phylogenetischen Analysen deutlich getrennt sowohl vom *S. mytilus*-Komplex als auch von der oben beschriebenen *Tetmemena*-Linie. Die taxonomische Zuordnung der Art *Stylonychia bifaria* variiert in der Literatur. Nach BERGER (2001) wird sie nun der Gattung *Tetmemena* zugeordnet. Unsere molekularen Analysen hingegen weisen darauf hin, dass es sich nicht um einen Vertreter der Gattung *Tetmemena* handelt, da sie gemeinsam mit den beiden Isolaten von *Sterkiella nova* gruppiert. Außerdem fällt die große genetische Distanz zwischen den beiden *S. nova*-Sequenzen auf, die letztlich auf getrennte Arten hindeutet. Der Status von *Stylonychia bifaria* muss in diesem Zusammenhang offen bleiben, da unseren und bisherigen Analysen zufolge die Gattung *Sterkiella* keine geschlossene Abstammungsgemeinschaft bildet. So sind die beiden *Sterkiella*-Arten (*S. nova* und *S. histriomusco-*

rum) deutlich voneinander separiert und stehen in verschiedenen Gruppen der Stylonychinae (Abb. 1; HEWITT et al. 2003; FOISSNER et al. 2004; SCHMIDT et al. 2007). *Sterkiella nova* findet sich stets in engerer Verwandtschaft mit *Tetmemena pustulata* als zu *Sterkiella histriomuscorum*. Eine ausführliche Diskussion bezüglich der zum Teil irreführenden taxonomischen Zuordnung dieser beiden Arten leisteten FOISSNER & BERGER (1999). Darüber hinaus bestätigen unsere molekularen Ergebnisse die von FOISSNER et al. (1991) vorgenommene Separierung von *S. histriomuscorum* aus der Gattung *Histriculus*, da sie deutlich getrennt von der hier neu untersuchten Art *H. histrio* gruppiert.

Eine sichere Artbestimmung stichotricher Ciliaten ist für einen Nichtspezialisten teilweise sehr schwierig, wie vielfach in der Literatur beschrieben wurde. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei manchen der in der GenBank befindlichen Sequenzen möglicherweise um Fehlbestimmungen handelt. Für eine abschließende Klärung der Taxonomie innerhalb der Stylonychinae erscheint daher eine umfassende molekulare Reanalyse basierend auf morphologisch sicher determinierten Isolaten unabdingbar.

Danksagung

Für die Überlassung von Isolaten bzw. von genomischer DNA möchten wir uns bei Prof. Dr. Wilhelm FOISSNER (Universität Salzburg) und Dr. Günther STEINBRÜCK (Universität Tübingen) bedanken. Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (Schl 229/12-1 und Schl 229/12-2).

Zusammenfassung

Basierend auf Sequenzanalysen der 18S rDNA wurden die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Stylonychinae, insbesondere der Gattungen *Stylonychia*, *Tetmemena* und *Sterkiella*, untersucht. Die Ergebnisse bestätigen die klare Trennung zwischen der Gattung *Stylonychia* bestehend aus Vertretern des *S. mytilus*-Komplexes und der Gattung *Tetmemena* mit *T. pustulata*. Die neu untersuchte *Stylonychia notophora* gruppiert demnach mit *Tetmemena pustulata*, während *Stylonychia ammermanni* dem *S. mytilus*-Komplex angehört. Die Gattung *Sterkiella* stellt kein Monophylum dar, weil die Isolate von *S. nova* und *S. histriomuscorum* zwei deutlich getrennte Abstammungslinien bilden. Zudem gruppiert die ebenfalls neu untersuchte *Stylonychia bifaria* innerhalb der *S. nova*-Gruppe. Zur weiterführenden Aufklärung der Taxonomie innerhalb der Stylonychinae sind weitere molekulare Untersuchungen, insbesondere von sicher determinierten Isolaten, erforderlich.

Literatur

AMMERMANN D. & SCHLEGEL M. (1983): Characterization of two sibling species of the genus *Stylonychia* (Ciliata, Hypotricha): *S. mytilus* EHRENBERG, 1838 and *S. lemnae* n. sp. I. Morphology and reproductive behavior. — J. Protozool. **30**: 290–294.

BERGER H. (1999): Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia). — Monographiae Biol. **78**: 1–1080.

BERGER H. (2001): Catalogue of ciliate names. 1. Hypotrichs. — Verlag H. Berger, Salzburg.

BERGER H. & FOISSNER W. (1997): Cladistic relationships and generic characterization of oxytrichid hypotrichs (Protozoa, Ciliophora). — Arch. Protistenk. **148**: 125–155.

BERNHARD D., STECHMANN A., FOISSNER W., AMMERMANN D., HEHN M. & SCHLEGEL M. (2001): Phylogenetic relationships within the class Spirotrichea (Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. — Mol. Phylogenet. Evol. **21**: 86–92.

CHANG W.J., BRYSON P.D., LIANG H., SHIN M.K. & LANDWEBER L.F. (2005): The evolutionary origin of a complex scrambled gene. — Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. **102**: 15149–15154.

EIGNER P. (1997): Evolution of morphogenetic processes in the Orthoamphisiellidae n. fam., Oxytrichidae, and Parakahliellidae n. fam., and their depiction using a computer method (Ciliophora, Hypotrichida). — J. Euk. Microbiol. **44**: 553–573.

EIGNER P. (1999): Comparison of divisional morphogenesis in four morphologically different clones of the genus *Gonostomum* and update of the natural hypotrich system (Ciliophora, Hypotrichida). — Europ. J. Protistol. **35**: 34–48.

ELWOOD H.J., OLSEN G.J. & SOGIN M.L. (1985): The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. — Mol. Biol. Evol. **2**: 399–410.

FOISSNER W. & BERGER H. (1999): Identification and ontogenesis of the nomen nudum hypotrichs (Protozoa: Ciliophora) *Oxytricha nova* (= *Sterkiella nova* sp. n.) and *O. trifallax* (= *S. histriomuscorum*). — Acta Protozool. **38**: 215–248.

FOISSNER W. & T. STOECK (2006): *Rigidothrix goiseri* nov.gen., nov. spec. (Rigidotrichidae nov. fam.), a new flagship ciliate from the Niger floodplain breaks the flexibility-dogma in the classification of stichotrichine spirotrichs (Ciliophora, Spirotrichea). — Europ. J. Protistol. **42**: 249–267.

FOISSNER W., BLATTERER H., BERGER H. & KOHMANN F. (1991): Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiesystems – Band 1: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. — Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft **1/91**: 1–478.

FOISSNER W., MOON-VAN DER STAAY S.Y., VAN DER STAAY G.W.M., HACKSTEIN J.H.P., KRAUTGARTNER W.-D. & BERGER H. (2004): Reconciling classical and molecular phylogenies in the stichotrichines (Ciliophora, Spirotrichea), including new sequences from some rare species. — Europ. J. Protistol. **40**: 265–281.

GUPTA R., KAMRA K., ARORA S. & SAPRA G.R. (2001): *Stylonychia ammermanni* sp. n., a new oxytrichid (Ciliophora: Hypotrichida) ciliate from the river Yamuna, Delhi, India. — Acta Protozool. **40**: 75–82.

HALL T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. — Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95–98.

HEWITT E.A., MÜLLER K.M., CANNONE J., HOGAN D.J., GUTELL R. & PRESCOTT D.M. (2003): Phylogenetic relationships among 28 spirotrichous ciliates documented by rDNA. — Mol. Phylogenet. Evol. **29**: 258–267.

HUELSENBECK J.P. & RONQUIST F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. — Bioinformatics **17**: 754–755.

KORTE A., RIBERA I., BEUTEL R. G. & BERNHARD D. (2004): Interrelationships of staphyliniform groups inferred from 18S and 28S rDNA sequences, with spezial emphasis on Hydrophiloidea (Coleoptera, Staphyliniformia). — J. Zool. Syst. Evol. Res. **42**: 281–288.

KUMAR S., TAMURA K. & NEI M. (2004): MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. — Briefings in Bioinformatics **5**: 150–163.

POSADA D. & CRANDALL K.A. (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. — Bioinformatics **14**: 817–818.

SCHLEGEL M., ELWOOD H.J. & SOGIN M.L. (1991): Molecular evolution in hypotrichous ciliates: sequence of the small subunit ribosomal RNA genes from *Onychodromus quadricornutus* and *Oxytricha granulifera* (Oxytrichidae, Hypotrichida, Ciliophora). — J. Mol. Evol. **32**: 64–69.

SCHMIDT S.L., BERNHARD D., SCHLEGEL M. & FOISSNER W. (2007): Phylogeny of the Stichotrichia (Ciliophora; Spirotrichea) reconstructed with nuclear small subunit rRNA gene sequences: discrepancies and accordances with morphological data. — J. Eukaryot. Microbiol. **54**: 201–209.

SCHMIDT S.L., BERNHARD D., SCHLEGEL M. & FRIED J. (2006): Fluorescence in situ hybridization with specific oligonucleotide rRNA probes distinguish between the sibling species *Stylonychia lemnae* and *Stylonychia mytilus* (Ciliophora, Spirotrichea). — Protist **157**: 21–30.

SHI X.-B. & AMMERMANN D. (2004): *Stylonychia harbinensis* sp. n., a new oxytrichid ciliate (Ciliophora, Hypotrichia) from the Heilongjiang Province, China. — Protistology **3**: 219–222.

STEINBRÜCK G. & SCHLEGEL M. (1983): Characterization of two sibling species of the genus *Stylonychia* (Ciliata, Hypotrichia): *S. mytilus* EHRENBERG, 1838 and *S. lemnae* n. sp. II. Biochemical characterization. — J. Protozool. **30**: 294–300.

SWOFFORD D.L. (2002): PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. — Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TAMURA K. & NEI M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. — Mol. Biol. Evol. **10**: 512–526.

THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F. & HIGGINS D.G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. — Nucleic Acids Res. **25**: 4876–4882.

WIRNSBERGER E., FOISSNER W. & ADAM H. (1985): Morphological, biometric, and morphogenetic comparison of two closely related species, *Stylonychia vorax* and *S. pustulata* (Ciliophora: Oxytrichidae). — J. Protozool. **32**: 261–268.

WYLEZICH C., MEISTERFELD R., MEISTERFELD S. & SCHLEGEL M. (2002): Phylogenetic analyses of small subunit ribosomal RNA coding regions reveal a monophyletic lineage of euglyphid testate amoebae (order Euglyphida). — J. Eukaryot. Microbiol. **49**: 108–118.

Anschrift der Verfasser:

Dr. Stephanie L. SCHMIDT
Dr. Detlef BERNHARD
Prof. Dr. Martin SCHLEGEL (korrespondierender Autor)
Molekulare Evolution und Systematik der Tiere
Institut für Biologie II
Universität Leipzig
Talstraße 33
04103 Leipzig
Germany
E-Mail: sschmidt@rz.uni-leipzig.de
bernhard@rz.uni-leipzig.de
schlegel@rz.uni-leipzig.de